

(12) NACH DEM VERTRÄG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
27. September 2001 (27.09.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/70272 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61K 47/48** (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT01/00079
- (22) Internationales Anmeldedatum:
21. März 2001 (21.03.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
A 471/2000 21. März 2000 (21.03.2000) AT
- (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): IGENEON KREBS-IMMUNTHERAPIE FORSCHUNGS- UND ENTWICKLUNGS- AG [AT/AT]; Brunnerstrasse 59, A-1230 Wien (AT).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): LOIBNER, Hans [AT/AT]; Heimgasse 23, A-1238 Wien (AT). ECKERT, Helmut [CH/CH]; Hohe Strasse 167, CH-4104 Oberwil (CH).
- (74) Anwälte: SONN, Helmut usw.; Riemergasse 14, A-1010 Wien (AT).



(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:
— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: POLYSACCHARIDE-POLYPEPTIDE CONJUGATE

(54) Bezeichnung: POLYSACCHARID-POLYPEPTID KONJUGAT

(57) **Abstract:** The invention relates to a method for producing a polysaccharide-polypeptide conjugate by reacting a polysaccharide with a polypeptide comprising at least one free amino group. A polysaccharide carrier having vicinal hydroxy groups is oxidized onto the polypeptide whereby the ring is opened so as to create vicinal aldehyde groups and is reacted with one or more base-instable antigen polypeptide(s) containing at least one free amino group, the polypeptide(s) being bound directly to the polysaccharide carrier via at least one azomethine bond.

WO 01/70272 A1

(57) **Zusammenfassung:** Beschrieben wird ein Verfahren zur Herstellung eines Polysaccharid-Polypeptid Konjugates durch Umsetzung eines Polysaccharids mit einer mindestens eine freie Aminogruppe enthaltenden Polypeptid, wobei ein vicinale Hydroxylgruppen aufweisender Polysaccharid-Träger unter Ringöffnung zur Schaffung von vicinalen Aldehydgruppen oxidiert und mit einem oder mehreren basenlabilen antigenen Polypeptid(en), enthaltend mindestens eine freie Aminogruppe, umgesetzt wird, wobei das bzw. die Polypeptide über mindestens eine Azomethin-Bindung direkt an den Polysaccharid-Träger gebunden werden.

Polysaccharid-Polypeptid Konjugat

Die vorliegende Erfindung betrifft eine neuartige Verwendung von aufoxidierten Polysacchariden als Trägermaterial für Komponenten von Impfstoffen, insbesondere ein Verfahren zur Herstellung eines Polysaccharid-Polypeptid Konjugates durch Umsetzung eines Polysaccharids mit einem mindestens eine freie Aminogruppe enthaltenden Polypeptid sowie die Verwendung eines solchen Konjugates als Impfstoff.

Impfstoffe sind dadurch gekennzeichnet, dass ein oder mehrere Antigene in einer immunogenen Formulierung in kleiner Menge, meist parenteral (subkutan oder intramuskulär) verabreicht werden, um eine starke und protektive Immunantwort auszulösen. Die meisten Impfstoffe werden derzeit zum Schutz gegen mikrobielle Infektionen hergestellt. Die verwendeten Antigene sind in diesen Fällen inaktivierte und veränderte Mikroorganismen, oder Teile von solchen, oder definierte Proteine aus solchen Mikroorganismen, die geeignet sind, eine Immunantwort gegen den jeweiligen Mikroorganismus auszulösen.

Seit Jahren wird auch die Wirksamkeit vieler experimenteller Impfstoffe gegen andere Erkrankungen untersucht. Dazu gehören auch Impfstoffe gegen Krebs. Dabei soll das Immunsystem von Krebspatienten selektiv aktiviert werden, maligne Zellen zu bekämpfen. Das wird mittels verschiedenster Ansätze versucht. Dazu gehören Impfungen mit autologen oder allogenen Tumorzellen, chemisch oder molekularbiologisch modifizierten autologen oder allogenen Tumorzellen, isolierten oder mit Hilfe von chemischen oder molekularbiologischen Methoden hergestellten Tumor assoziierten Antigenen (TAA), daraus abgeleiteten Peptiden, anti-idiotypische Antikörper als Surrogat eines TAA, neuerdings auch Impfungen mit DNA, die für TAA oder daraus abgeleiteten Strukturen codieren, etc. Im Prinzip genügen sehr kleine Mengen eines geeigneten Impfstoffes, um für Monate bis Jahre eine Immunität zu induzieren, die bei Abschwächung durch Booster-Impfungen wieder aufgefrischt werden kann. Darüber hinaus kann bei aktiver Immunisierung sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunität induziert werden, deren Zusammenspiel eine effektive Schutzwirkung gegen Krebs ergeben kann.

Zur Erreichung einer starken Immunität werden Antigene in Impfstoffen meistens zusammen mit einem Adjuvans verabreicht. Als Beispiele für Adjuvantien, jedoch nicht auf diese eingeschränkt, seien erwähnt: Aluminiumhydroxid (Alu-Gel), Derivate von Lipopolysaccharid, Bacillus Calmette Guerin (BCG), Liposomenbereitungen, Formulierungen mit zusätzlichen Antigenen, gegen die das Immunsystem bereits eine starke Immunantwort gemacht hat, wie z.B. Tetanus Toxoid, Pseudomonas Exotoxin, oder Bestandteile von Influenza-Viren, gegebenenfalls in einer Liposomenbereitung. Weiters ist bekannt, dass die Immunantwort auch durch die gleichzeitige Verabreichung von körpereigenen Proteinen verstärkt werden kann, die eine wichtige Rolle beim Aufbau einer Immunantwort spielen, wie zum Beispiel Granulozyten-Makrophagen stimulierender Faktor (GM-CSF), Interleukin 2 (IL-2), Interleukin 12 (IL-12) oder Gamma Interferon (IFNy).

Die US-5 554 730-B betrifft Polysaccharid-Protein Konjugate, wobei ein partikulärer Impfstoff geschaffen werden soll. Dafür wird primär durch Umsetzung eines Proteinträgers mit einem aufoxidierten Polysaccharid-Antigen in Gegenwart eines „crowding agents“ (Wasserverdrängers) ein Polysaccharid-Protein Konjugat als Schiff'sche Base (Azomethin) geschaffen, wobei der Proteinträger aufgrund der Gegenwart des „crowding agents“ sofort denaturiert und das Konjugat in Form von Mikropartikeln ausfällt. Ein Auflösen der ausgefällten Mikropartikeln in stark basischem Milieu (0,1 n NaOH) zum Erhalt einer Impflösung ist zwar prinzipiell möglich und auch geoffenbart, jedoch nur für den Fall der Verwendung eines Polysaccharid-Antigens sinnvoll, da aufgrund der Denaturierung ein allfälliges antigenes Protein seine antigenen Determinanten verloren hätte und daher nicht mehr wirksam wäre.

Die WO 99/55715 beschreibt Polysaccharid-Antigen Konjugate, wobei das Antigen entweder über einen geeigneten bivalenten Linker oder über eine endständige Aldehydgruppe an das Polysaccharid gebunden sind. Eine direkte Bindung des Antigens an das Polysaccharid über eine Azomethin-Bindung ist somit auf die Anzahl der im Polysaccharid vorhandenen endständigen Aldehydgruppen beschränkt.

Auch die DE-198 21 859-A1 beschreibt Polysaccharid-Antigen Konjugate, wobei ein geeigneter Crosslinker mittels Azomethin-Bindung an durch Perjodatoxidation erhaltene Aldehydfunktionen im Polysaccharid gebunden wird. Im Crosslinker wird zusätzlich eine Maleimidofunktion vorgesehen, an welche sich eine -SH Gruppe von Cystein addieren kann. Die zum Einsatz kommenden Antigene werden sodann N- oder C-terminal mit einem zusätzlichen Cys versehen, um die Addition der endständigen SH-Funktion mit dem Crosslinker und somit den Erhalt der beschriebenen Polysaccharid-Antigen Konjugate zu ermöglichen.

Die US-5 846 951 schließlich betrifft Polysaccharide mit mindestens 5 Sialinsäureresten, welche Polysaccharide mittels Oxidation mit Natriumperjodat an den nichtreduzierenden Enden der Polysialinsäuren mit endständigen Aldehydgruppen versehen werden können. Derart geschaffene endständige Aldehydgruppen können dann über Azomethin-Bindungen aminogruppenhältige Arzneimittel, beispielsweise Proteine, binden.

Die meisten Antigene, die für Impfstoffe Verwendung finden, beinhalten Strukturen mit primären Aminogruppen. Insbesonders haben alle Proteinantigene im Normalfall zumindestens ein, aber meistens mehrere Lysine in ihrer Aminosäuresequenz. Die Aminogruppen dieser Lysine liegen frei vor.

Es ist seit langem bekannt, dass primäre Amine eine Reaktion mit Aldehyden eingehen können. Das Produkt dieser Reaktion wird Schiff'sche Base genannt. Schiff'sche Basen sind nicht völlig stabile Verbindungen, sie können unter geeigneten Bedingungen hydrolysiert und damit in ihre Ausgangsstoffe zurückgeführt werden.

Es ist weiters bekannt, dass Verbindungen, die vicinale Hydroxylgruppen beinhalten, mit Hilfe von geeigneten Oxidantien, insbesondere mit Perjodsäure oder Salzen der Perjodsäure wie Natrium-meta-perjodat, so oxidiert werden können, dass unter Bruch der C-C

Bindung, an denen die benachbarten Hydroxylgruppen sitzen, zwei Aldehydfunktionen entstehen.

Eine große Zahl von hochmolekularen Polysacchariden bestehen aus monomeren Zuckereinheiten, die vicinale Hydroxylgruppen tragen. Als zwei Beispiele, jedoch nicht auf diese eingeschränkt, seien Dextran und Mannan angeführt. Solche Polysaccharide können daher mit Perjodat in oben beschriebener Weise aufoxidiert werden, ohne dass die Bindungen zwischen den Monomeren gespalten werden. Wenn, bezogen auf die Zahl der Monomereinheiten, ein stöchiometrischer Unterschuss von Perjodat eingesetzt wird, findet die Oxidation nur partiell statt, das heißt, es werden nach einem Zufallsprinzip nur soviele Monomere aufoxidiert, wie der Menge von Perjodat entspricht.

Der vorliegenden Erfindung liegt nun die Aufgabe zugrunde, weitere Mittel und Methoden zur Verfügung zu stellen, die zu immunogenen Formulierungen von Impfstoffen führen.

Diese Aufgabe wird bei einem Verfahren der eingangs angegebenen Art dadurch gelöst, dass ein vicinale Hydroxylgruppen aufweisender Polysaccharid-Träger unter Ringöffnung zur Schaffung von vicinalen Aldehydgruppen aufoxidiert und mit einem oder mehreren basenlabilen antigenen Polypeptid(en) enthaltend mindestens eine freie Aminogruppe umgesetzt wird, wobei das bzw. die Polypeptide über mindestens eine Azomethin-Bindung direkt an den Polysaccharid-Träger gebunden werden. Partiell aufoxidierte Polysaccharide stellen somit ein geeignetes Trägermaterial zur Formulierung von Impfstoffen dar, wenn die zum Einsatz kommenden basenlabilen antigenen Polypeptide ein oder mehrere freie primäre Aminogruppen enthalten und so mit den im Trägermaterial durch Ringöffnung geschaffenen vicinalen Aldehydgruppen über eine Azomethin-Bindung verbunden werden können. Vorzugsweise sind die erfindungsgemäß verwendeten basenlabilen antigenen Polypeptide bis zu einem pH von etwa 11 stabil, bevorzugt bis zu einem pH von etwa 10, noch bevorzugter bis zu einem pH von etwa 9, am bevorzugtesten bis zu einem pH von etwa 8. Wenn im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung Polypeptide erwähnt werden, so werden darunter Proteine mit mindestens 6 Aminosäuren in der Kette verstanden. Gleichartig werden unter Polysacchariden Mehrfachzucker mit mindestens 3 Monomereinheiten in der Kette verstanden. Bevorzugt verwendete Polysaccharide sind dabei Mannan, beispielsweise mit einem Molekulargewicht von mindestens 70 kDa und Dextran, beispielsweise mit einem Molekulargewicht von mindestens 70 kDa, besonders bevorzugt mit einem Molekulargewicht von etwa 2000 kDa.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden die im Polysaccharid-Träger ursprünglich vorhandenen vicinalen Hydroxylgruppen zumindest teilweise aufoxidiert, vorzugsweise zumindest zu 20 %. Durch eine Steuerung der Oxidationsrate, z.B. mittels stöchiometrischem Unterschuss an Oxidationsmittel, kann die Menge an für eine Azomethin-Bindung zwischen Träger und Polypeptid zur Verfügung stehenden Aldehydgruppen leicht eingestellt werden.

Vorzugsweise ist dabei das basenlabile antigene Polypeptid ein Vakzinantigen, besonders bevorzugt ein Antikörper, z.B. ein monoklonaler Antikörper, wie der murine monoklonale Antikörper HE2. Eine neuartige Methode der Krebsvakzinierung ist in der Anmeldung PCT/EP00/00174 (Priorität 13.1.1999) „Verwendung von Antikörpern zur Vakzinierung gegen Krebs“, beschrieben, deren Offenbarung hier durch Bezugnahme aufgenommen wird. Der darin beschriebene monoklonale Antikörper HE2, der als Vakzin-Antigen in einer Krebsimpfung verwendet wird, dient als Beispiel, jedoch nicht auf dieses eingeschränkt, für die Formulierung eines Impfstoffes nach der hier beschriebenen Methode der Konjugierung an ein partiell oxidiertes hochmolekulares Polysaccharid.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weist das basenlabile antigene Polypeptid dieselbe Bindungsfeinspezifität wie der Antikörper HE2 auf.

Günstig ist auch, wenn zusätzlich zu dem jeweiligen basenlabilen antigenen Polypeptid noch Substanzen konjugiert werden, die eine Verstärkung der Immunantwort bewirken, beispielsweise GM-CSF, IL-2, IL-12 oder Gamma Interferon oder eine Mischung dieser Substanzen.

Weiters wird bevorzugt, wenn das erfindungsgemäße Polysaccharid-Polypeptid Konjugat noch zusätzlich an Aluminiumhydroxid adsorbiert und/oder mit pharmazeutisch annehmbaren Trägern gemischt wird.

Schlussendlich wird bevorzugt, wenn das erfindungsgemäß erhaltene Polysaccharid-Polypeptid Konjugat als Vakzinformulierung zur Verabreichung durch subcutane, intradermale oder intramuskuläre Injektionen formuliert ist, z.B. durch Lösen bzw. Suspendieren des gegebenenfalls auf beispielsweise Aluminiumhydroxid adsorbierten Konjugats in einem geeigneten physiologischen Puffer und dergl.

Allgemein seien folgende Vorteile und spezifische Eigenschaften des erfindungsgemäßen Konjugats angeführt:

- Die über primäre Amine an die autoxidierten Polysaccharide angekoppelten Bestandteile (Konjugat und Hilf- bzw. Zusatzstoffe) werden in Gegenwart eines Überschusses von Molekülen mit freien primären Aminen, wie beispielsweise Serumproteinen, langsam abgelöst. Der dadurch entstehende „Slow Release“ Effekt ist für Impfstoffe gewünscht, da dadurch Antigen-präsentierende Zellen die Impfantigene länger lokal an der Impfstelle aufnehmen können.
- Durch die Wahl des Polysaccharides können die Eigenschaften des Konjugates beeinflusst werden. Das betrifft sowohl die molekulare Größe des Polysaccharides als auch dessen chemische Zusammensetzung. Wird zum Beispiel Mannan als Polysaccharid gewählt, wird das entsprechende Konjugat bevorzugt von Zellen des Immunsystems aufgenommen, die den Mannoserezeptor tragen. Dazu gehören insbesondere Makrophagen und dendritische Zellen als professionelle Antigen-präsentierende Zellen. Dadurch wird eine gesteigerte Immunantwort erreicht.

- Es können an partiell autoxidierte Polysaccharide gleichzeitig mehrere Komponenten gebunden werden. Das können mehrere unterschiedliche Vakzinantigene sein, oder auch Vakzinantigene zusammen mit Komponenten, die die Immunantwort verstärken, wie zum Beispiel die Proteine GM-CSF, IL-2, IL-12 oder Gamma Interferon.

Die beiliegende Abb. 1 zeigt den Vergleich von zwei Formulierungen hinsichtlich der Induktion von Antikörpern gegen HE2 (ELISA) in Rhesusaffen.

B e i s p i e l :

Zunächst wird Dextran mit einem Molekulargewicht von 2000 kDa (SIGMA D-5376) mit Natriummetaperjodat zu 20% autoxidiert. Zu diesem Zweck werden 324 mg Dextran in 4 ml destilliertem Wasser unter Rühren gelöst. Zu dieser Lösung werden 86 mg von vorher in 0,6 ml destilliertem Wasser gelösten Natriummetaperjodat zugegeben und 30 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. 25 mg des Antikörpers HE2 (PCT/EP00/00174) werden mit 1 M Na₂HPO₄ auf pH 7,4 gebracht und 45 µl einer Thimerosalösung (10 mg/ml) zugegeben.

Zu dieser Lösung werden 1,675 ml der oben erhaltenen oxidierten Dextranlösung gegeben und 2 Tage bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Die Vollständigkeit der Reaktion wird durch Chromatographie an einer Molekulargewichtssäule (Zorbax 450) analytisch überprüft. Das Signal entsprechend einem Molekulargewicht von 150 kDa (monomericer HE2) ist verschwunden und es tritt statt dessen ein Signal im Ausschlussvolumen der Säule auf, das einem Molekulargewicht von > 2000 kDa entspricht.

Die erhaltene Lösung wird mit Hilfe einer präparativen Molekulargewichtssäule chromatographiert, die mit dem endgültigen Puffer (1mM Phosphatpuffer in physiologischer Kochsalzlösung, pH = 5,5) äquilibriert ist. Das im Ausschlussvolumen erhaltene Material besteht aus dem hochmolekularen Konjugat des Antikörpers HE2 an partiell autoxidiertem Dextran. Der Gehalt an konjugiertem HE2 kann durch Integration des Signales nach analytischer Chromatographie an einer Molekulargewichtssäule im Vergleich zu monomeren HE2 bestimmt werden. Die erhaltene Lösung wird mit einem wässrigen Aluminiumhydroxid so vermischt, dass die Endkonzentration 0,5 mg HE2 an 1,67 mg Aluminiumhydroxid in 0,5 ml Puffer beträgt.

Vier Rhesusaffen wurden an den Tagen 1, 15, 29 und 57 subcutan mit 0,5 ml obiger Formulierung immunisiert. Die Sera von verschiedenen Zeitpunkten wurden mittels ELISA auf Induktion von Antikörpern gegen monomeres HE2 getestet. Als Vergleich wurden vier Rhesusaffen in gleicher Weise mit einer Standardformulierung von 0,5 mg monomeren HE2 adsorbiert an 1,67 mg Aluminiumhydroxid, geimpft.

Der ELISA wurde wie folgt durchgeführt:

100 µl Aliquots des MAK HE2 (Lösung mit 10 µg/ml in Bindungspuffer) werden in den Löchern einer Mikrotiterplatte 1 h bei 37°C inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen der Platte mit Waschpuffer A werden je 200 µl des Blockierungspuffers A zugesetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Waschen der Platte wie oben beschrieben werden je 100 µl Aliquots der zu

testenden Affensera in Verdünnungen von 1:100 bis 1:1 000 000 in Verdünnungspuffer A 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Waschen der Platte wie oben beschrieben werden je 100 µl des Peroxidase-konjugierten Ziegen anti-Human-Ig Antikörpers (Zymed) in einer Verdünnung von 1:1000 in Verdünnungspuffer A zugesetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Platte wird viermal mit Waschpuffer A und zweimal mit Färbeypuffer gewaschen. Die Antikörperbindung wird durch Zusatz von je 100 µl des spezifischen Substrats nachgewiesen und die Farbreaktion durch Zugabe von je 50 µl Stopplösung nach ca. 10 min abgebrochen. Die Auswertung erfolgt durch Messen der optischen Dichte (OD) bei 490 nm (Wellenlänge der Referenzmessung ist 620 nm).

Die Ergebnisse des ELISA sind in Abbildung 1 dargestellt. Die mit dem Konjugat von HE2 an Dextran geimpften Tiere entwickelten vergleichbare Titer von Antikörpern gegen HE2 wie die mit der Standardformulierung geimpften Affen.

Weiters wurde untersucht, wie weit HE2 nach Applikation im Serum der Affen wiederzufinden ist. Dazu wurde wieder ein ELISA eingesetzt, der wie folgt durchgeführt wurde:

100 µl Aliquots eines gereinigten polyklonalen anti-idiotypischen Ziegenantikörpers gegen HE2 (Lösung mit 10 µg/ml in Bindungspuffer) werden in den Löchern einer Mikrotiterplatte 1 h bei 37°C inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen der Platte mit Waschpuffer A werden je 200 µl des Blockierungspuffers zugesetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Waschen der Platte wie oben beschrieben werden je 100 µl Aliquots der zu testenden Affensera in Verdünnungen von 1:4 bis 1:100 000 in Verdünnungspuffer A 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Waschen der Platte wie oben beschrieben werden je 100 µl eines Peroxidase-konjugierten Ziegen anti-Maus-IgG Antikörpers (Zymed) in einer Verdünnung von 1:1000 in Verdünnungspuffer zugesetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Platte wird viermal mit Waschpuffer und zweimal mit Färbeypuffer gewaschen. Die Antikörperbindung wird durch Zusatz von je 100 µl des spezifischen Substrats nachgewiesen und die Farbreaktion durch Zugabe von je 50 µl Stopplösung nach ca. 10 min abgebrochen. Die Auswertung erfolgt durch Messen der optischen Dichte (OD) bei 490 nm (Wellenlänge der Referenzmessung ist 620 nm).

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

Zeitpunkt	Konjugat Vakzine	Standardformulierung
0	0; 0; 0; 0 ng/ml	0; 0; 0; 0 ng/ml
1 h	0; 0; 0; 0 ng/ml	13; 17; 74; 280 ng/ml
4 h	0; 0; 0; 0 ng/ml	200, 280, 400, 740 ng/ml
24 h	0; 0; 0; 0 ng/ml	960, 960, 1000, 740 ng/ml

Nach 24 h ist bei den Tieren, die das Konjugat geimpft bekommen hatten, eine Andeutung einer HE2-Konzentration im Serum zu erkennen, die aber unter der Nachweissgrenze von ca. 10 ng HE2 / ml Serum liegt. Offensichtlich ist die Desorption des Vakzinantigens durch die Konjugation an partiell oxidiertes Dextran im Vergleich zur Standardformulierung deutlich verringert worden. Dadurch können vermutlich weniger Impfungen zur Erreichung eines vergleichbaren Titers ausreichen als bei einer Standardformulierung auf Aluminiumhydroxid.

Verwendete Materialien:

Mikrotiterplatten: Immuno Plate F96 MaxiSorp (Nunc) für ELISA

Bindungspuffer: 15 mM Na₂CO₃
35 mM NaHCO₃
3 mM NaN₃
pH-Wert: 9,6

PBS deficient: 138 mM NaCl
1,5 mM KH₂PO₄
2,7 mM KCl
6,5 mM Na₂HPO₄
pH-Wert: 7,2

Waschpuffer : 0,05 % Tween 20 in PBS deficient

Blockierungspuffer : 5 % foetales Kälberserum (hitzeinaktiviert)
in PBS deficient

Verdünnungspuffer: 2% foetales Kälberserum (hitzeinaktiviert)
in PBS deficient

Färbe puffer: 24,3 mM Zitronensäure
51,4 mM Na₂HPO₄
pH-Wert: 5,0

Substrat: 40 mg o-Phenyldiamin Dihydrochlorid
100 ml Färbe puffer
20 µl H₂O₂ (30%)

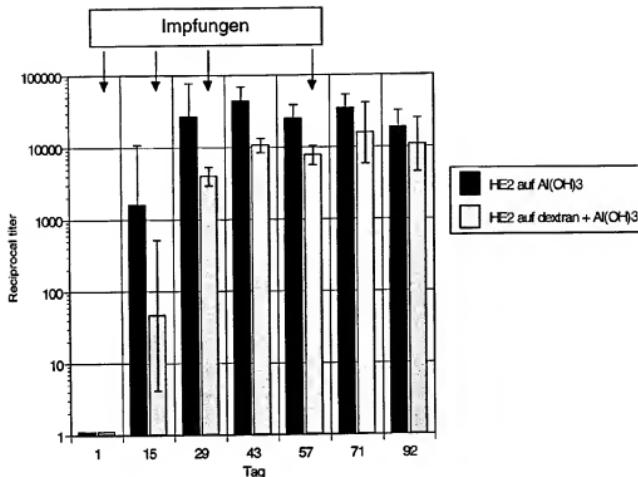
Stopplösung: 4 N H₂SO₄

PATENTANSPRÜCHE:

1. Verfahren zur Herstellung eines Polysaccharid-Polypeptid Konjugates durch Umsetzung eines Polysaccharids mit einem mindestens eine freie Aminogruppe enthaltenden Polypeptid, dadurch gekennzeichnet, dass ein vicinale Hydroxylgruppen aufweisender Polysaccharid-Träger unter Ringöffnung zur Schaffung von vicinalen Aldehydgruppen autoxidiert und mit einem oder mehreren basenlabilen antigenen Polypeptid(en) enthaltend mindestens eine freie Aminogruppe umgesetzt wird, wobei das bzw. die Polypeptide über mindestens eine Azomethin-Bindung direkt an den Polysaccharid-Träger gebunden werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das bzw. die antigene(n) Polypeptid(e) bis zu einem pH von etwa 11 stabil ist bzw. sind.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das bzw. die antigene(n) Polypeptid(e) bis zu einem pH von etwa 10 stabil ist bzw. sind.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das bzw. die antigene(n) Polypeptid(e) bis zu einem pH von etwa 9 stabil ist bzw. sind.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das bzw. die antigene(n) Polypeptid(e) bis zu einem pH von etwa 8 stabil ist bzw. sind.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Polysaccharid Mannan, vorzugsweise mit einem Molekulargewicht von mindestens 70 kDa, verwendet wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Polysaccharid Dextran, vorzugsweise mit einem Molekulargewicht von mindestens 70 kDa, besonders bevorzugt mit einem Molekulargewicht von etwa 2000 kDa, verwendet wird.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die im Polysaccharid-Träger ursprünglich vorhandenen vicinalen Hydroxylgruppen zumindest teilweise autoxidiert werden, vorzugsweise zumindest zu 20 %.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass als basenlabiles antigenes Polypeptid ein Vakzinantigen verwendet wird.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass als Vakzinantigen ein Antikörper verwendet wird.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass als Antikörper ein monoklonaler Antikörper verwendet wird.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass als monoklonaler Antikörper der Antikörper HE2 verwendet wird.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass der Antikörper dieselbe Bindungsfeinspezifität wie der Antikörper HE2 aufweist.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich zu den jeweiligen basenlabilen antigenen Polypeptid noch Substanzen konjugiert werden, die eine Verstärkung der Immunantwort bewirken.
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei diesen Substanzen um GM-CSF, IL-2, IL-12 oder Gamma Interferon oder um eine Mischung dieser Substanzen handelt.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass das Konjugat noch zusätzlich an Aluminiumhydroxid adsorbiert ist.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass das Konjugat mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger gemischt wird.
18. Konjugat erhältlich nach einem der Ansprüche 1 bis 17.
19. Konjugat nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass es zur Verabreichung durch subcutane, intradermale oder intramuskuläre Injektionen formuliert ist.

Abbildung 1: Induktion von Antikörpern gegen HE2 (ELISA) in Rhesusaffen - Vergleich von zwei Formulierungen



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

I National Application No
PCT/AT 01/00079

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
P, X	MEHVAR R: "Dextrans for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, vol. 69, no. 1, 3 October 2000 (2000-10-03), pages 1-25, XP004217531 ISSN: 0168-3659 paragraphs '4.2.1!, '5.1.2!, '05.3!; figure 7; tables 3,4 ---	1-19
X	US 6 011 008 A (POLACHECK ITZHACK ET AL) 4 January 2000 (2000-01-04) the whole document ---	1-19 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *C* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

S document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
25 May 2001	08/06/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patenttaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl. Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer Döpfer, K-P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/AT 01/00079

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	WO 99 49897 A (HEMOSOL INC) 7 October 1999 (1999-10-07) page 9, line 3 -page 13, line 19; claims; examples ----	1-8, 17-19
X	WO 96 20012 A (MIDDLESEX SCIENCES INC) 4 July 1996 (1996-07-04) claims ----	1-19
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 198050 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A96, AN 1980-89664C XP002168294 & SU 730 694 A (MEDIC ENZYMES ANTIB), 30 April 1980 (1980-04-30) abstract -----	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/AT 01/00079

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 6011008	A 04-01-2000	NONE		
WO 9949897	A 07-10-1999	AU EP	2918099 A 1066057 A	18-10-1999 10-01-2001
WO 9620012	A 04-07-1996	US	5554730 A	10-09-1996
SU 730694	A 30-04-1980	NONE		

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

P - nationales Aktenzeichen

FHT/AT 01/00079

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K47/48

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBiete

Recherchierte Mindestpräzision (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)
IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestpräzisionsgehalt gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P, X	MEHVAR R: "Dextrans for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, Bd. 69, Nr. 1, 3. Oktober 2000 (2000-10-03), Seiten 1-25, XP004217531 ISSN: 0168-3659 Absätze '4.2.1., '5.1.2!, '05.3!; Abbildung 7; Tabellen 3,4 --- US 6 011 008 A (POLACHECK ITZHACK ET AL) 4. Januar 2000 (2000-01-04) das ganze Dokument ---	1-19
X	---	1-19 -/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:
- *' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E' älteres Dokument, das jedoch erst später nach dem internationalen Anmeldezeitraum veröffentlicht wurde
- *L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchebericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgetauschtes Dokument)
- *O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldezeitraum, aber nach dem beanspruchten Fälligkeitstag veröffentlicht worden ist

- *T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldezeitraum oder dem Fälligkeitstag veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kolidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *V' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie verbunden gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nachlegend ist
- *Z' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Abschlussdatum des internationalen Rechercheberichts
25. Mai 2001	08/06/2001
Name und Postanschrift der internationalen Recherchebehörde Europäische Patentamt, P.B. 5815 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Döpfer, K-P

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

I - nationales Aktenzeichen
PCT/AT 01/00079

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGEGEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 99 49897 A (HEMOSOL INC) 7. Oktober 1999 (1999-10-07) Seite 9, Zeile 3 -Seite 13, Zeile 19; Ansprüche; Beispiele ----	1-8, 17-19
X	WO 96 20012 A (MIDDLESEX SCIENCES INC) 4. Juli 1996 (1996-07-04) Ansprüche ----	1-19
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 198050 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A96, AN 1980-89664C XP002168294 & SU 730 694 A (MEDIC ENZYMES ANTIB), 30. April 1980 (1980-04-30) Zusammenfassung -----	1-19

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen:

PCT/AT 01/00079

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie			Datum der Veröffentlichung
US 6011008	A 04-01-2000	KEINE			
WO 9949897	A 07-10-1999	AU 2918099 A	18-10-1999	EP 1066057 A	10-01-2001
WO 9620012	A 04-07-1996	US 5554730 A	10-09-1996		
SU 730694	A 30-04-1980	KEINE			